

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/ES05/000171

International filing date: 01 April 2005 (01.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: ES  
Number: P200402862  
Filing date: 26 November 2004 (26.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 27 May 2005 (27.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE DE INVENCION número P 200402862, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 2004-11-26.

INDICACIÓN DE PRIORIDAD: El código del país con el número de su solicitud de prioridad, que ha de utilizarse para la presentación de solicitudes en otros países en virtud del Convenio de París, es: ES 200402862.

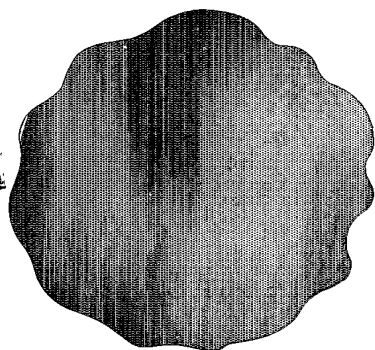
Madrid, 9 de Mayo de 2005

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica

P.D.



ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ







MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

**P200402862**

**4 NOV 26 16:46**

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: CÓDIGO

(1) MODALIDAD:  
☒ **PATENTE DE INVENCION** ☐ **MODELO DE UTILIDAD**

(2) TIPO DE SOLICITUD:  
☐ ADICIÓN A LA PATENTE  
☐ SOLICITUD DIVISIONAL  
☐ CAMBIO DE MODALIDAD  
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA  
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:  
MODALIDAD  
N° SOLICITUD  
FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME
ITALFARMACO, S.A.		Española	ES	A-78570611	244	4

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO **c/ San Rafael, 3**  
LOCALIDAD **Alcobendas**  
PROVINCIA **Madrid**  
PAÍS RESIDENCIA **España**  
NACIONALIDAD **Española**

TELÉFONO **91 657 23 23**  
FAX **91 657 23 60**  
CORREO ELECTRÓNICO **bbanfi@itfsp.com**  
CÓDIGO POSTAL **28108**  
CÓDIGO PAÍS **ES**  
CÓDIGO PAÍS **ES**

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Dpto. SECRETARÍA GENERAL  
REPROCHAFIA  
Panamá, 1 - Madrid 28071

(7) INVENTOR (ES):	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS
MOSCO DEL PRADO CHANTRES ANTORANZ		JAIME JOSÉ RAMÓN	Española Española	ES ES

(8) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR  
☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:  
☒ INVENC. LABORAL ☐ CONTRATO ☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:  
**FORMULACIONES LIPOSOMALES**

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: ☐ SI ☐ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
PAÍS DE ORIGEN			

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES ☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) ( RELLENESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN N° DE PÁGINAS: <b>15</b> <input checked="" type="checkbox"/> N° DE REIVINDICACIONES: <b>21</b> <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N° DE PÁGINAS: <b>1</b> <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS N° DE PÁGINAS: <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN <input checked="" type="checkbox"/> OTROS: <b>DECLARACIÓN ADQUISICIÓN DERECHOS</b>
--	--

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE  
*[Firma]*  
(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO  
*[Firma]*

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:  
Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

**P200402862**

FECHA DE PRESENTACIÓN

☒ **PATENTE DE INVENCION**

☐ **MODELO DE UTILIDAD**

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O  
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO  
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

**ELORZA BARROETA  
ELORZA BARROETA  
CÓRDOBA DÍAZ**

**MARÍA ÁNGELES  
BEGOÑA  
MANUEL**

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO  
PAÍS

NÚMERO

FECHA

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

**P200402862**

FECHA DE PRESENTACIÓN

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Formulaciones liposomales de sustancias hidrofílicas, útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o condiciones del ser humano o animal, preferiblemente de aplicación tópica en piel y/o mucosas.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO

gls



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

EJEMPLAR ORIGINAL

NÚMERO DE SOLICITUD

P200402862

12

# SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(31) NÚMERO		DATOS DE PRIORIDAD	(32) FECHA	(33) PAÍS	(22) FECHA DE PRESENTACIÓN
(71) SOLICITANTE (S)					(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA
ITALFARMACO, S.A.					
DOMICILIO C/ San Rafael, 3 - 28108 Alcobendas (Madrid)		NACIONALIDAD Española			
		España			
(72) INVENTOR (ES)		Moscoso Del Prado, Jaime; Chantres Antoranz, José Ramón; Elorza Barroeta, María Ángeles; Elorza Barroeta, Begoña; Córdoba Díaz, Manuel.			
(51) Int. Cl.		GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)			
(54) TÍTULO DE LA INVENCION					
FORMULACIONES LIPOSOMALES					
(57) RESUMEN		Formulaciones liposomales de sustancias hidrofílicas, útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o condiciones del ser humano o animal, preferiblemente de aplicación tópica en piel y/o mucosas.			

## FORMULACIONES LIPOSOMALES

- La invención se refiere a formulaciones de sustancias hidrofílicas encapsuladas en liposomas, al método de encapsulación de las sustancias hidrofílicas en los liposomas y al uso de dichas formulaciones en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y/o condiciones del ser humano o animal.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- Los liposomas son vesículas microscópicas que poseen una cavidad central acuosa rodeada por una membrana lipídica formada por bicapa(s) concéntrica(s). Los liposomas pueden ser unilamelares (es decir tener una única bicapa lipídica) u oligolamelares o multilamelares (si tienen varias bicapas). Las vesículas multilamelares (MLVs) tienen un tamaño que va desde 0,2  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  mientras que las unilamelares pueden ser grandes (LUVs) o pequeñas (SUVs) con un tamaño entre 0,02 y 0,2  $\mu\text{m}$ . Por su estructura tienen capacidad de incorporar sustancias hidrofílicas (en el interior acuoso) o hidrofóbicas (en la membrana lipídica).
- Los componentes estructurales más importantes de los liposomas son los fosfolípidos (PLs). Para obtener liposomas con propiedades específicas se pueden utilizar fosfolípidos con carga neutra, positiva o negativa y/o con diferente longitud y grado de saturación de las cadenas de ácidos grasos.
- Asimismo, para modificar las propiedades de los liposomas se puede, por ejemplo, incorporar colesterol (COL) a la membrana, modificar el número de bicapas lipídicas o unir covalentemente moléculas naturales (por ejemplo proteínas, polisacáridos, glicolípidos, anticuerpos, enzimas) o sintéticos (por ejemplo polietilenglicol) a su superficie.
- En suma, las variables a considerar en el momento de diseñar un liposoma son múltiples y los resultados no son siempre los esperados.

- Como vehículos para la administración de fármacos, los liposomas tienen, en teoría, numerosas ventajas. Además de estar constituidos por componentes no tóxicos, generalmente no inmunogénicos, no irritantes y biodegradables, deberían



ser capaces de encapsular, retener, transportar y ceder a órganos diana una gran variedad de agentes terapéuticos, reduciendo sus efectos secundarios (adversos).

5 Sin embargo, el objetivo de desarrollar de formulaciones liposomales óptimas desde el punto de vista técnico y terapéutico es alcanzado en contadas ocasiones.

En particular, las vesículas liposomales óptimas deben ser capaces de:

- encapsular el agente activo en su interior en un porcentaje elevado, de modo que la eficacia de encapsulación (relación entre cantidad de fármaco encapsulado y lípido) sea adecuada desde el punto de vista de la dosificación y del costo de la formulación;
- ser estables, es decir retener el agente activo encapsulado durante la vida útil de la formulación y, una vez administradas al paciente, hasta alcanzar el sitio de acción;
- 15 - liberar el fármaco en el sitio de acción con un perfil de cesión adecuado al objetivo terapéutico, reduciendo la toxicidad sistémica.

Por otra parte, y en el caso específico de administración tópica, los lípidos que forman las vesículas liposomales deben conferir ciertas propiedades a la bicapa lipídica de modo que los liposomas resultantes promuevan la rápida penetración del principio activo a través del stratum corneum y su localización en el sitio de acción deseado (normalmente en las proximidades de la capa basal de la epidermis).

25 Si bien en estudios previos se ha conseguido encapsular sustancias hidrofílicas (de bajo peso molecular y carácter polar) en liposomas, la retención del agente activo en el interior de los mismos continúa siendo un problema técnico a solucionar como queda demostrado en los siguientes trabajos.

Norley S.G. et al., [J.Immunol. 136 : 681-685 (1986)], utilizando liposomas neutros compuestos por fosfatidilcolina (PC) de huevo y colesterol 15:1 preparados por el método deshidratación-rehidratación (DRV), obtienen una retención de 44% de aciclovir al cabo de 14 días a 4 °C y de 48 % luego de 24 horas a 37 °C.

35 Law S.L. et al., [Int.J.Pharm. 161 :253-259 (1998)], empleando liposomas MLV de PC de huevo y colesterol 1,6:1, neutros y cargados mediante adición de dicetilfosfato o estearilamina en relaciones molares entre 0,15 y 1,6, logran a las

10 horas a 37 °C una retención de aciclovir entre 75 % y menos de 25 % (según la cantidad de carga) para los de carga positiva, entre 90 % y 35 % (según la cantidad de carga) para los de carga negativa y entre 80 % y 60 % para los neutros.

- 5 Fresta M. et al., [J.Parm.Pharmacol.51 :565-576 (1999)] utilizando liposomas compuestos por DPPC:COL 7:4 (neutros rígidos), DPPC:COL 7:4:1 (carga negativa rígidos) y DPPC:Colesterol:DDAB 7:4:1 (carga positiva rígidos), obtienen una retención de aciclovir entre 50 y 30 % a las 8 horas a 37°C para los OLV (con mínimas retenciones para neutros y negativos) y entre 65 % y 45 % a las 8 horas a 37 °C para los MLV (con mínimas retenciones para neutros y negativos).
- 10 Sarbolouki MN, Toliat T. PDA, [J Pharm Sci Technol 52: 23-27 (1998)] empleando liposomas compuestos por EPC (flexibles, neutros), de tamaño MLV y REV, consiguen una retención de metotrexato a los 30 días de 70% a 4°C; 40% a 25°C y <10 % a 37°C.
- 15 Khopade AJ, et al. [Int. J. Pharm. 232: 157-162 (2002)] utilizando liposomas MLV constituidos por HSPC:COL (neutros, rígidos) y HSPC:COL:DCP (negativos, rígidos), obtienen una retención de metotrexato de 35% a las 8 horas a 37°C.
- 20 Norley SG, et.al., [J. Immunol 136: 681-685 (1986)] empleando liposomas compuestos por PC de huevo (poliinsaturada, flexible) y colesterol 15:1 (neutros), preparados por el método DRV, consiguen una retención de iododeoxiuridina de 50% a las 24 horas a 4°C y 20% a la hora a 37 °C.
- 25 Simmons SP, Kramer PA., [J Pharm Sci 66: 984-986 (1977)] utilizando liposomas MLV constituidos por esfingomielina (SM):COL:DCP 4.8:2.8:1 (negativos), obtienen una retención de floxuridina de 70% a las 40 horas a 25°C
- Maurer N. et al., [BBA 1374: 9-20 (1998)] empleando liposomas LUV compuestos por DPPC:COL 55:45 (neutros, rígidos), logran una retención de ciprofloxacino de 20% a los 30 min a 25°C.

30

En suma, si bien se ha logrado encapsular agentes activos hidrofílicos en liposomas permanece el problema de que éstos sean estables, es decir que retengan el principio activo en su interior.

## RESUMEN DE LA INVENCION

- Existe por lo tanto la necesidad de disponer de formulaciones farmacéuticas de principios activos hidrófilos encapsulados en liposomas que tengan alta eficacia de encapsulación, sean estables y posean un perfil de cesión del fármaco adecuado al objetivo terapéutico y no tóxico para el paciente.
- Los inventores de la presente han encontrado que el empleo de una mezcla de fosfolípidos saturados neutros y de lípidos saturados con carga en la preparación de liposomas permite alcanzar estos objetivos.
- Es así que han logrado obtener formulaciones estables de fármacos hidrofílicos, en las que el principio activo permanece encapsulado en el interior de los liposomas durante el tiempo necesario para la preparación, almacenamiento y distribución de las correspondientes formulaciones farmacéuticas hasta la administración al paciente.
- Asimismo, y para el caso específico de la aplicación tópica, han conseguido que dichas formulaciones tengan una buena difusión en piel, alcanzando la epidermis y teniendo allí un efecto depot, y no manifiesten signos de toxicidad (irritación cutánea) tras su aplicación dérmica reiterada. Cabe esperar que también muestren buena difusión en mucosas.
- En consecuencia, el uso de una combinación de PLs saturados neutros y lípidos saturados con carga permite obtener composiciones tópicas de fármacos hidrofílicos y bajo peso molecular que tienen alta estabilidad, eficacia (basada en una buena difusión cutánea del fármaco) y seguridad (debida a una baja absorción sistémica).
- Por otra parte, el empleo de una mezcla de PLs saturados neutros y lípidos saturados con carga permitiría encapsular en liposomas no solo fármacos sino también otras sustancias hidrofílicas tales como agentes diagnósticos, cosméticos, sustancias alimenticias, etc.
- De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a formulaciones liposomales que comprenden al menos un agente activo hidrofílico encapsulado en liposomas constituidos por una o varias bicapas lipídicas formadas por una mezcla de al menos un fosfolípido saturado neutro y al menos un lípido saturado con carga.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de encapsulación de sustancias activas hidrofílicas en los liposomas, es decir al método de preparación de dichas formulaciones liposomales.

5

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de las mencionadas formulaciones liposomales en la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de patologías o condiciones del ser humano o animal.

- 10 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a las formulaciones farmacéuticas o veterinarias que contiene dichas formulaciones liposomales y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 Previo a la descripción de las realizaciones particulares, cabe definir algunos términos específicos vinculados a los aspectos principales de la presente invención, con fines aclaratorios, no limitativos.

Se entiende por formulaciones liposomales aquellas en la que parte o todo el principio activo se encuentra encapsulado en el interior de liposomas.

- 20 Los liposomas pueden estar constituidos por una o varias bicapas de lípidos y tener diferente tamaño.  
Las bicapas tienen superficie polar (interior y exterior) y núcleo no polar.

- 25 Se entiende por fosfolípido a aquel derivado anfifílico del glicerol en el que uno de sus grupos hidroxilo está esterificado con ácido fosfórico y los otros dos hidroxilos están esterificados con ácidos grasos de cadena larga.

Un fosfolípido saturado será aquel cuyos ácidos grasos no tengan dobles enlaces carbono-carbono.

- 30 Un fosfolípido neutro será generalmente aquel en el que otro hidroxilo del ácido fosfórico está esterificado por un alcohol sustituido con un grupo polar (habitualmente hidroxilo o amino) y cuya carga neta es cero.

Un fosfolípido con carga será generalmente aquel en el que otro hidroxilo del ácido fosfórico está esterificado por un alcohol sustituido por un grupo polar y cuya carga neta es positiva o negativa.

Se entiende que lípido saturado con carga, además de incluir a los fosfolípidos saturados con carga, comprende a otros compuestos anfifílicos cuya carga neta es distinta de cero, tales como derivados hidrocarbonados de cadena larga, sustituidos por un grupo polar (por ejemplo amino) y derivados de ácidos grasos.

5

En el contexto de la presente invención, se consideran fármacos hidrofílicos aquellos que exhiben un log Pow (logaritmo decimal del coeficiente de reparto octanol/agua) menor de cero.

Asimismo, se consideran fármacos de bajo peso molecular aquellos que poseen un peso molecular inferior a 1000 Da.

10

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En principio, cualquier PL saturado neutro y cualquier lípido saturado con carga pueden ser utilizados en las formulaciones liposomales de la presente invención.

15

En una realización preferida, el PL saturado neutro es elegido del grupo formado por derivados de fosfatidilcolina y sus mezclas, por ejemplo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y sus mezclas.

20

En otra realización preferida, el PL saturado con carga es seleccionado del grupo formado por derivados de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfático y sus mezclas, por ejemplo, diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y una mezcla de ésteres de fosfatidilserina (PS) con diferentes ácidos grasos saturados (por ejemplo PS de cerebro bovino).

25

En otra realización preferida, el lípido saturado con carga es estearilamina (SA).

En principio, cualquier relación entre PL neutros y lípidos con carga puede ser utilizada en las formulaciones de esta invención.

30

En una realización preferida, la relación molar PL neutros / lípidos con carga estará entre 50/50 y 95/5, preferentemente entre 80/20 y 95/5.

Cualquier sustancia hidrofílica podría ser encapsulada en las formulaciones

35

liposomales de esta invención. Preferiblemente, dicha sustancia es un fármaco; más preferiblemente es un fármaco hidrofílico de bajo peso molecular.

En una realización preferida, la relación molar fármaco hidrofílico / lípidos estará entre 40:1 y 0.01:1, más preferiblemente estará entre 2:1 y 0.1:1

- 5 El límite inferior viene determinado por la menor cantidad de fármaco que resulte práctica para hacer liposomas dado su pretendido uso y puede ser fácilmente determinado por un experto en la materia. El límite superior está condicionado por la concentración de cristalización del fármaco.
- 10 Las formulaciones liposomales proporcionadas por esta invención pueden además contener otros componentes lipídicos como esteroides (por ejemplo colesterol) o esfingolípidos (por ejemplo esfingomielinas y glicoesfingolípidos, en particular gangliósidos).
- 15 En principio, cualquier fármaco hidrofílico puede ser encapsulado en las formulaciones liposomales de la presente invención.  
En el caso de formulaciones liposomales de aplicación tópica, el fármaco hidrofílico es preferiblemente de bajo peso molecular.  
En realizaciones preferidas, el agente farmacológicamente activo es seleccionado entre aciclovir, iododeoxiuridina, metotrexato, fluorouracilo y ciprofloxacino
- 20 Fármacos, PLs y demás componentes de las formulaciones de la presente invención son conocidos por un experto en la materia y pueden ser obtenidos de fuentes comerciales.
- 25 Las formulaciones liposomales de la presente invención pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la materia.  
El tamaño de los liposomas resultantes va a depender del método de preparación empleado. En una realización preferida los liposomas son preparados de acuerdo al método expuesto en los Ejemplos 1 y 4.
- 30 Los liposomas resultantes pueden ser deshidratados (liofilizados) para su posterior formulación y/o almacenamiento y distribución.  
Asimismo, los liposomas pueden mantenerse en suspensión en una solución acuosa que contiene o no fármaco. En el primer caso, la suspensión resultante contendrá parte del fármaco encapsulado en el interior de los liposomas y parte en
- 35 el exterior de los mismos.

Las formulaciones liposomales proporcionadas por esta invención van a ser particularmente útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o condiciones del ser humano o animal.

Las presentes formulaciones liposomales han demostrado ser particularmente útiles y ventajosas en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o condiciones de piel y/o mucosas.

10 Preferiblemente, las formulaciones liposomales de la presente invención se administrarán en un vehículo farmacéuticamente aceptable, que va a estar constituido por al menos un excipiente. Dicho excipiente puede ser seleccionado entre cualquiera de los conocidos por un experto en la materia y de acuerdo con la vía de administración a emplear, la que dependerá del objetivo terapéutico buscado.

15 Para la administración parenteral, el vehículo suele estar constituido por agua y sustancias auxiliares requeridas para hacerlo compatible con las condiciones fisiológicas tales como agentes reguladores de pH, de tonicidad, etc. La solución acuosa resultante puede ser esterilizada por métodos convencionales y envasada para su uso, o filtrada y liofilizada, lo que puede requerir el uso de agentes crioprotectores. El material liofilizado será combinado con una solución acuosa estéril previo a su administración.

20 Para la administración tópica, el vehículo va a estar constituido por excipientes seleccionados de acuerdo con la forma farmacéutica que se pretenda en cada caso, preferiblemente líquida o semisólida. Las formulaciones líquidas incluyen soluciones acuosas, soluciones hidroalcohólicas, lociones, etc. Las formulaciones semisólidas van a ser mayoritariamente pomadas, cremas o geles.

25 Cualquiera de estas formulaciones puede requerir el empleo de conservantes, agentes antioxidantes, quelantes, sistemas reguladores de pH, conservantes, polímeros bioadhesivos, etc.

30 El agente conservante puede ser seleccionado entre, por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico, parabenos y sus mezclas. El antioxidante puede ser elegido, a modo de ejemplo, entre hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol y tocoferol y sus derivados. El agente quelante puede ser seleccionado, por ejemplo, del grupo formado por ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol

35

bis-(2aminoetil)-tetraacético (EGTA) y ácido cítrico o sus sales. El sistema regulador de pH puede ser elegido, a modo de ejemplo, entre una solución tampón fosfato y una solución tampón citrato.

En una realización particularmente preferida, las composiciones farmacéuticas o veterinarias de la presente invención se formularán para administración por vía  
5 tópica, en piel o mucosas.

Las dosis de agente farmacológicamente activo a administrar al paciente va a depender de la indicación terapéutica de la formulación, de la respuesta del  
10 paciente al tratamiento y de la terapia concomitante.

## ENSAYOS

Las propiedades inesperadas y ventajosas de las formulaciones de la presente  
15 invención se manifiestan a través los siguientes ensayos "in-vitro" e "in-vivo" no limitativos.

### A- PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN Y ENSAYOS DE ESTABILIDAD

**EJEMPLO 1.** Encapsulación estable de aciclovir (ACV) en liposomas MLV de  
20 composición DSPC:DSPG

Se añaden a un matraz de rotavapor DSPC y DSPG en una relación molar 9:1 y cloroformo: metanol en una relación 2:1 (v:v). Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40°C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta  
25 formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente, se reduce la presión a 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata por agitación con 9 ml de una solución acuosa de aciclovir sódico (50 mg/ml) a 65°C  
30 durante 1 hora en el rotavapor.

Los liposomas multilamelares así obtenidos son procesados mediante extrusión a través de membranas de policarbonato con poros de 2,0 µm. A continuación el aciclovir no encapsulado se elimina por diafiltración, primero frente a tres volúmenes de una solución de NaCl 150 mM, pH 11.5 y a continuación frente a 5-  
35 6 volúmenes de tampón fosfato 10mM pH 6.0, 150 mM NaCl. Para ello se



utilizan membranas Vivaflow 50 con un corte de 100KD (Sartorius). Los liposomas resultantes se diluyen con el mismo tampón, la solución se fracciona en alícuotas que se almacenan en viales de polipropileno a 25°C hasta su análisis.

5 Para determinar el ACV total presente en la suspensión liposómica, primero se deben disueltos los lípidos de la membrana liposómica y se libera su contenido mediante dilución de la suspensión en metanol. Luego se determina la concentración de ACV mediante espectroscopia a 254 nm frente a una curva de calibración.

10 Para determinar el ACV encapsulado, se sedimentan previamente los liposomas mediante centrifugación durante 25 minutos a 26.000 g, recogiendo el sobrenadante. Posteriormente se analiza el contenido de ACV en el sobrenadante por el procedimiento anteriormente descrito.

La diferencia entre el ACV total y el presente en el sobrenadante representa la fracción encapsulada. En el ejemplo descrito, la concentración de ACV total se ajustó a 0.555 mg/ml, estando un 96.3% del mismo encapsulado en el interior de los liposomas al comienzo del estudio. La relación molar ACV/lípido fue de 0,83.

La Figura 1 muestra la evolución del porcentaje de ACV encapsulado (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de 4 meses a 25°C. El análisis de la misma permite concluir que los liposomas de la presente invención, constituidos por una mezcla de PLs saturados neutros y saturados con carga, muestran una elevada estabilidad.

25 **EJEMPLO 2.** Encapsulación estable de aciclovir (ACV) en liposomas LUV de composición DPPC:Colesterol:DPPG

Se añaden a un matraz de rotavapor DPPC, DPPG y Colesterol en relación molar 60:10:40 y cloroformo:metanol en una relación 2:1 (v:v). Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40 °C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión a 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así

formada se hidrata agitando con 9 ml de una solución acuosa de aciclovir sódico (50 mg/ml) a 55°C durante 1 hora en el rotavapor.

Los liposomas así obtenidos se procesan de forma análoga al ejemplo 1, salvo que la extrusión se realiza a través de membranas con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ .

- 5 El análisis del ACV total y encapsulado se realiza por el mismo procedimiento que el ejemplo 1. Los liposomas resultantes exhiben una relación molar ACV/lípido de 0.52, con un 98.4% del ACV encapsulado en el interior de los liposomas. No se detectó variación en el porcentaje de ACV encapsulado a lo largo de un total de 6 semanas a 25°C.

10

**EJEMPLO 3.** Encapsulación no estable de aciclovir (ACV) en liposomas LUV de compuestos por palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC).

Se preparan liposomas según lo descrito en el ejemplo 2, sustituyendo los lípidos por POPC.

- 15 El análisis de ACV encapsulado se realiza siguiendo la metodología descrita en el ejemplo 2, comprobándose que utilizando un PL neutro pero insaturado, únicamente un 27.3% del ACV inicial permanece retenido en el interior de los liposomas al cabo de 24 horas.

- 20 **EJEMPLO 4.** Encapsulación no estable de aciclovir (ACV) en liposomas LUV de composición POPC:DPPG

Se preparan liposomas según lo descrito en el ejemplo 2, sustituyendo los lípidos por POPC y DPPG en relación molar 9:1.

- 25 El análisis de ACV encapsulado se realiza siguiendo la metodología descrita en el ejemplo 2, comprobándose que empleando una mezcla que contiene un PL neutro insaturado, únicamente un 38.1% del ACV inicial permanece retenido en el interior de los liposomas al cabo de 24 horas.

- 30 **EJEMPLO 5.** Encapsulación no estable de aciclovir (ACV) en liposomas LUV de composición DPPC:Colesterol

Se preparan liposomas según lo descrito en el ejemplo 2, sustituyendo los lípidos por DPPC y colesterol en relación molar 6:4.

El análisis de ACV encapsulado se realiza siguiendo la metodología descrita en el ejemplo 2, comprobándose que utilizando una mezcla de lípidos que no

contiene un PL saturado con carga, únicamente un 25.4% del ACV inicial permanece retenido en el interior de los liposomas al cabo de 24 horas.

**EJEMPLO 6.** Encapsulación estable de iododeoxiuridina (IDUR) en liposomas MLV de composición DSPC:DSPG

- Se añaden a un matraz de rotavapor DSPC y DSPG en una relación molar 9:1 y cloroformo: metanol en una relación 2:1 (v:v). Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40°C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión a 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata por agitación con 50 ml de una solución acuosa de iododeoxiuridina (2 mg/ml) a 65°C durante 1 hora en el rotavapor.
- La suspensión liposómica formada se extruye a través de filtros de polycarbonato de 2 µm de poro para homogeneizar el tamaño de las vesículas formadas. Finalmente, el fármaco no encapsulado se elimina mediante diafiltración frente a 6 volúmenes de un tampón fosfato salino (pH 6; 150mM NaCl). Para ello se utilizan membranas Vivaflow 50 con un corte de 100KD (Sartorius). Los liposomas resultantes se diluyen con el mismo tampón, se alicuotan en viales de polipropileno y se almacenan a 25°C hasta su análisis.

- Para determinar el IDUR total presente en la suspensión liposómica, primero se disuelven los lípidos de la membrana liposómica y se libera su contenido mediante dilución de la suspensión en metanol. Luego se determina la concentración de IDUR mediante espectroscopia a 284 nm frente a una curva de calibración.

- Para determinar el IDUR encapsulado, se sedimentan previamente los liposomas mediante centrifugación durante 25 minutos a 26.000 g, recogiendo el sobrenadante. Posteriormente se analiza el contenido de IDUR en el sobrenadante por el procedimiento anteriormente descrito.

La diferencia entre el IDUR total y el presente en el sobrenadante representa la fracción encapsulada. En el ejemplo descrito, la concentración de IDUR total se

ajustó a 0.555 mg/ml, estando un 97.8% del mismo encapsulado en el interior de los liposomas al comienzo del estudio. La relación molar IDUR/lípido fue de 0,04

5 La Figura 2 muestra la evolución del porcentaje de encapsulación (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de 2 meses. El análisis de la misma permite concluir que los liposomas de la presente invención, constituidos por una mezcla de PLs saturados neutros y saturados con carga, muestran una elevada estabilidad.

## 10 B- DIFUSIÓN EN PIEL

### EJEMPLO 7.

Se prepararon liposomas de acuerdo al ejemplo 2 y se ajustó la suspensión resultante hasta una concentración de ACV de 1 mg/ml. Simultáneamente se  
15 preparó una solución de referencia de ACV de 1 mg/ml en el mismo tampón que los liposomas. Tanto la suspensión de liposomas como la solución de ACV de referencia se ensayaron en pruebas de difusión en piel tal y como se describe a continuación.

20 Los ensayos de difusión se realizan en un equipo de flujo continuo con células PermeGear ILC-07 de 0,69 cm<sup>2</sup> de superficie, utilizando piel dorsal de ratones sin pelo (SKH1). A efectos de estandarizar los datos, se utiliza una concentración fija de ACV de 1 mg/ml, diluyendo para ello adecuadamente las suspensiones de liposomas preparadas según el ejemplo 2. Como referencia se utiliza una solución  
25 de ACV en el mismo tampón. Todas las pruebas se realizan disponiendo 200 µl de la solución o suspensión liposomal en la célula donadora.

Las muestras de piel de los ratones, una vez eliminada la grasa subcutánea, se montan en las celdas de difusión. Como líquido receptor (en contacto con la dermis) se utiliza tampón fosfato 10 mM, 150mM NaCl, pH 6. El tampón  
30 termostatzado a 37°C se circula en la cámara de difusión a un flujo constante de 0.5 mlh<sup>-1</sup>. Todas las muestras se hidratan durante un mínimo de 1 hora antes del comienzo de la difusión, que procedió por un total de 18 horas. Pasado ese tiempo, las membranas de piel se lavan 3 veces con tampón fosfato isotónico pH 6, y se secan cuidadosamente con una punta de algodón. Se analiza el ACV  
35 presente tanto en piel completa y como en epidermis. Para esto último, una vez

realizada la difusión, las membranas de piel se lavan y secan como se ha descrito y el estrato córneo se elimina aplicando y retirando 10 veces consecutivas sendas tiras de cinta adhesiva sobre la superficie de la piel.

Una vez lavadas y cortadas, las muestras de piel o epidermis se congelan y descongelan repetidamente en nitrógeno líquido, y se les añade 1 ml de NaOH 0.5N. La suspensión obtenida se incuba 16 horas a 50°C para su solubilización. Finalizado este tiempo, las muestras se centrifugan retirándose la solución evitando la capa de grasa de la superficie y se filtra por filtros de nylon de 0.2 µm. En este punto las muestras se congelan hasta su procesamiento previo al análisis.

10

Las muestras obtenidas como se describe en el párrafo anterior se diluyen con NaOH 0.5 N y se precipitan las proteínas con HClO<sub>4</sub> 5N. Posteriormente se centrifugan las muestras y se recoge el sobrenadante filtrándolo con filtros de nylon de 0.2 µm directamente en viales de inyección de HPLC. El análisis de las muestras se realiza mediante HPLC, utilizando una columna Discovery Amide C16 de 250 x 4.6 mm y partículas de 5µm (Supelco) con las siguientes condiciones cromatográficas:

15

- Eluyente: Agua
- Flujo: 1.5 ml/min
- Detección: 254 nm
- Temperatura: 27°C
- Volumen de inyección: 50µl

20

Los resultados se muestran en la Tabla 1. El análisis de la misma permite concluir que los liposomas según la invención tienen un importante efecto promotor de la difusión del ACV en piel, llegando el ACV encapsulado en ellos a las capas profundas de piel viable más allá del estrato córneo en cantidades entre 3 y 4 veces superiores a las obtenidas con el fármaco en solución.

25

	N (cada grupo)	ACV liposomal	ACV en solución	Significación de diferencia
<b>Piel completa</b>	12	0.89 ± 0.40	0.21 ± 0.18	p=0.0131
<b>Epidermis</b>	6	0.37 ± 0.19	0.13 ± 0.7	P<0.0001

30

Tabla 1. Niveles de ACV en piel tras 18 horas de difusión (%dosis aplicada ± D.E.)

## FORMULACIONES GALÉNICAS

- 5 Los liposomas de la presente invención pueden ser vehiculizados en distintas composiciones farmacéuticas, algunas de las cuales se exponen a continuación de forma no limitativa.

	a.- Loción	
	Suspensión de liposomas	c.s.p. alcanzar dosis deseada de fármaco
10	Glicerina	50 g
	Fosfato disódico	0.044 g
	Fosfato monosódico	0.124 g
	Kathon® CG	0.05 g
	Agua	c.s.p. 100 %
15	2.- Gel	
	Suspensión de liposomas	c.s.p. alcanzar dosis deseada de fármaco
	Carbopol® 980 <sup>1</sup>	0.5 – 1g
	Trietanolamina	c.s.p. pH = 6.5
20	Kathon® CG	0.05 g
	Propilenglicol	0.5 g
	Glicerina	15 g
	Agua	c.s.p. 100 %

- 25 <sup>1</sup> En lugar de Carbopol, se puede utilizar otro agente gelificante como:

	Poloxamer 407	15 – 20%
	Carboximetilcelulosa	1- 10%
	Hidroxietilcelulosa	1 – 5%
	Hidroxipropilmetilcelulosa	1 – 15%
30	Metilcelulosa	1-5%

### 3- Solución parenteral

- Suspensión de liposomas  
Tampón fosfato salino  
35 Solución isotónica de cloruro de sodio

## REIVINDICACIONES

1. Formulaciones liposomales que comprenden al menos un agente activo hidrofílico encapsulado en liposomas constituidos por al menos una bicapa lipídica formada por una mezcla de al menos un fosfolípido saturado neutro y al menos un lípido saturado con carga.  
5
2. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el fosfolípido saturado neutro es elegido entre derivados de fosfatidilcolina y sus mezclas.  
10
3. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 2 caracterizadas porque el derivado de fosfatidilcolina es seleccionado entre DSPC, DPPC y DMPC.  
15
4. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el lípido saturado con carga negativa es elegido del grupo formado por derivados de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y sus mezclas.  
20
5. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 4 caracterizadas porque el lípido es seleccionado entre DSPG y ésteres de fosfatidilserina con diferentes ácidos grasos saturados.
- 25 6. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el lípido saturado con carga positiva es estearilamina.
7. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6 que además pueden contener al menos otro lípido seleccionado entre esteroides y derivados, gangliósidos y esfingomielinas.  
30
8. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 7 caracterizado porque el esteroide es colesterol.

9. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el agente activo hidrofílico es un fármaco seleccionado entre aciclovir, iododeoxiuridina, metotrexato y ciprofloxacino.
- 5 10. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 9 que comprenden aciclovir encapsulado en liposomas constituidos por DPPC:COL:DPPG.
11. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 9 que comprenden aciclovir encapsulado en liposomas constituidos por DSPC:DSPG.
- 10 12. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizadas porque los lípidos de la bicapa se encuentran en una relación molar PLs saturados neutros / lípidos saturados con carga entre 50/50 y 95/5.
- 15 13. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizadas porque la relación molar agente activo hidrofílico / lípidos está entre 40:1 y 0,01:1.
- 20 14. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores que además pueden contener al menos un antioxidante seleccionado de tocoferol y sus derivados, BHT, hidroxianisol y sus mezclas.
- 25 15. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores que además contienen un agente quelante seleccionado entre ácido cítrico o sus sales, EDTA, EGTA y sus mezclas.
- 30 16. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores que además contienen al menos un sistema tampón (buffer) seleccionado entre solución tampón fosfato y solución tampón citrato..
17. Formulaciones farmacéuticas que contienen formulaciones liposomales de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.



18. Formulaciones farmacéuticas de acuerdo a la reivindicación 17 para la administración tópica de agentes farmacológicamente activos.
- 5 19. Uso de las formulaciones liposomales de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o condiciones del ser humano o animal.
- 10 20. Uso de acuerdo a la reivindicación 19 en la que la enfermedad o condición afecta a piel y/o mucosas.
21. Procedimiento de preparación de formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 16 que comprende:
- disolver los lípidos en una mezcla de solventes orgánicos;
  - 15 - eliminar los solventes hasta formar una película de lípidos en las paredes del recipiente que los contiene;
  - hidratar la película por agitación con una solución acuosa del agente activo;
  - si se desea, extrudir la suspensión liposómica formada a través de filtros para seleccionar el tamaño vesicular;
  - 20 - someter a diafiltración la suspensión resultante frente a una solución tampón;
  - si se desea, diluir la suspensión liposómica con una solución tampón.

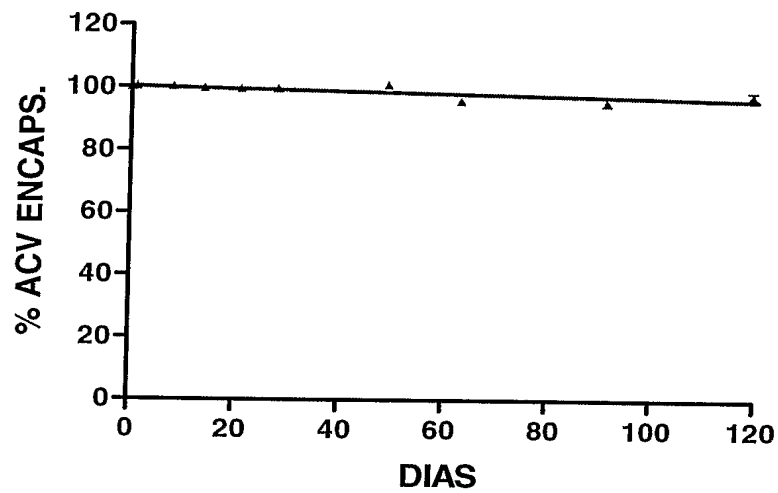


Fig. 1. Porcentaje de ACV encapsulado a 25°C.

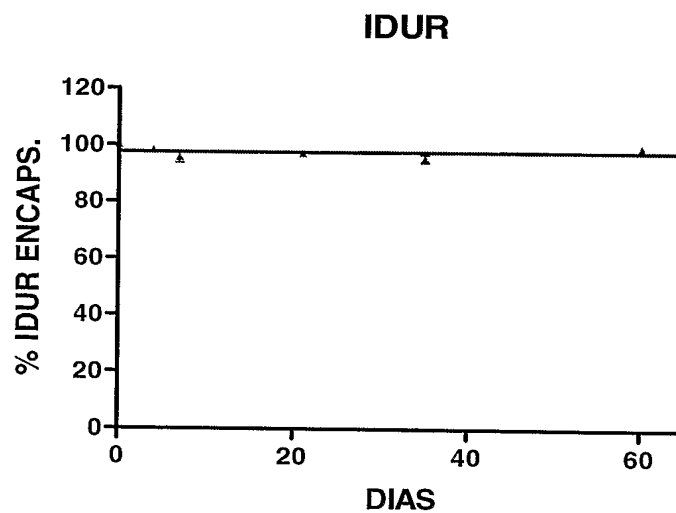


Fig. 2. Porcentaje de IDUR encapsulado a 25 °C

